

10/520258

REC'D 20 AUG 2003

WIPO PCT



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원 번호 : 10-2002-0038064
Application Number

출원 년 월 일 : 2002년 07월 02일
Date of Application JUL 02, 2002

출원인 : (주)넥스젠
Applicant(s) NEXGEN

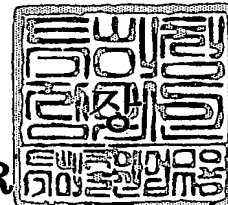
PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)



2003 년 08 월 01 일

특 허 청

COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【참조번호】 0001
【제출일자】 2002.07.02
【발명의 명칭】 형질전환 식물체로부터 갑상선자극호르몬 수용체의 생산
【발명의 영문명칭】 Production of Thyroid Stimulating Hormone Receptor Using Transformed Plants
【출원인】
【명칭】 (주)넥스젠
【출원인코드】 1-2000-021126-1
【대리인】
【명칭】 특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철)
【대리인코드】 9-2001-100004-2
【지정된변리사】 최홍순, 김경철, 양부현
【포괄위임등록번호】 2001-064645-5
【발명자】
【성명의 국문표기】 송민호
【성명의 영문표기】 SHONG, Min Ho
【주민등록번호】 610114-1462122
【우편번호】 301-150
【주소】 대전광역시 중구 태평동 푸른외아파트 108동 1501호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 이선교
【성명의 영문표기】 LEE, Sun
【주민등록번호】 580212-1010414
【우편번호】 305-390
【주소】 대전광역시 유성구 전민동 세종아파트 108동 703호
【국적】 KR
【발명자】
【성명의 국문표기】 유제근
【성명의 영문표기】 Y00, Jae Geun

【주민등록번호】	571007-1024114		
【우편번호】	300-768		
【주소】	대전광역시 동구 용전동 한숲아파트 112동 301호		
【국적】	KR		
【발명자】			
【성명의 국문표기】	진석민		
【성명의 영문표기】	JIN, Seok Min		
【주민등록번호】	730201-1032027		
【우편번호】	463-833		
【주소】	경기도 성남시 분당구 정자동 110번지 한솔마을 청구아파트 112동 14 02호		
【국적】	KR		
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 특허법인 세신(대표변리사 최홍순, 김경철) (인)		
【수수료】			
【기본출원료】	20	면	29,000 원
【가산출원료】	3	면	3,000 원
【우선권주장료】	0	건	0 원
【심사청구료】	0	항	0 원
【합계】	32,000 원		
【감면사유】	소기업 (70%감면)		
【감면후 수수료】	9,600 원		
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통 2. 소기업임을 증명하는 서류_1통		

【요약서】**【요약】**

본 발명은 형질전환식물체를 이용하여 증가된 면역활성을 가진 인체자가면역항원의 대량 생산을 통해 자가면역질환의 진단 및 치료에 관한 것이다.

【대표도】

도 6

【색인어】

감상선자극호르몬수용체, 인체자가면역항원, 아그로박테리움, 식물

【명세서】

【발명의 명칭】

형질전환 식물체로부터 갑상선자극호르몬 수용체의 생산{Production of Thyroid Stimulating Hormone Receptor Using Transformed Plants}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 *tshr* 유전자의 식물발현용 카세트를 나타내는 도면;

도 2는 *tshr-ecd* 유전자의 식물발현용 카세트를 나타내는 도면;

도 3은 식물체 형질전환용 벡터 *pRD400*에 클로닝된 *tshr* 또는 *tshr-ecd*를 나타내는 도면;

도 4는 *tshr* 형질전환식물체에서 형질전환된 *tshr* 유전자의 PCR을 나타내는 도면;

도 5는 *tshr-ecd* 형질전환식물체에서 형질전환된 *tshr-ecd* 유전자의 PCR을 나타내는 도면; 및

도 6은 그레이브 병의 환자로 부터 얻은 IgGs를 이용하여 형질전환 식물에서의 TSHR 단백질의 발현을 확인한 Western blot 분석을 나타내는 도면.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <7> 본 발명은 형질전환식물체를 이용하여 증가된 면역활성을 가진 인체자가면역항원의 대량 생산에 관한 것이다.
- <8> Molecular farming은 식물체에서 유전자재조합 단백질을 생산하는 기술이다. 최근 선진국에서는 molecular farming의 의학적 이용 가능성에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 여러 질환의 치료제로서 유전자재조합 단백질이 널리 이용되고 있는 실정에서 이러한 유전자재조합 단백질을 경제적 가치가 크고 안전한 제품으로 개발하기 위해서는 molecular farming 기술이 유용할 것으로 기대되고 있다. 형질전환 동물등에서 생산되는 의료용 단백질에 대해서는 광우병 등과 같은 인수공통전염병의 위험성이 있어 장기적 안전성에 문제점이 제기되고 있으며 제품생산에 있어서도 경제성이 낮다. 또한 의료용단백질을 prokaryotic expression system을 통해서 생산할 경우 일부 단백질에서 secondary modification이 일어나지 않는 문제점이 있어 치료제로서 효과가 없는 경우가 있다. 그러나 식물체에서 molecular farming 기술로 생산되는 재조합 단백질은 인수공통전염병의 위험성이 없으며, 대량생산이 용이하며, 적절한 secondary modification으로 우수한 치료효과를 나타낼 수 있는 단백질을 경제적으로 생산할 수 있다.
- <9> 세계적으로 전 인구의 약 10%는 류마티스성 관절염, 자가면역성 갑상선질환, 다발성 경화증, 인슐린 의존형 당뇨병, 자가면역성 피부질환 등의 다양한 자가면역질환에 이환 되어 있다. 모든 자가면역질환은 현재 근치적인 치료법이 없는 실정이며 주로 병증에 따라 치료하는 대중

적 요법과 장기간의 면역억제 치료를 시행하고 있는 실정이다. 최근 면역학의 발전에 따라서 이러한 자가면역질환의 치료 및 예방에 있어서 경구 및 비강을 통한 자가항원 투여에 의해서 면역학적 관용성(immunological tolerance)을 유도함으로써 자가면역반응을 억제하는 경구관용요법(oral tolerance)이 동물실험을 거쳐 수년 내 사람의 자가면역질환 치료에 있어서 광범위하게 적용될 것으로 예상된다(미합중국 특허 5,733,547 31.3.1998 Treatment of autoimmune arthritis by oral administration of type I or type II collagen). 경구관용요법의 임상적 사용을 위해서 해결해야할 가장 중요한 기술적 해결점은 어떻게 치료에 이용할 자가항원을 경제적인 방법을 통해서 대량 얻을 수 있는 가 하는 것이다. 왜냐하면 경구관용요법의 가장 중심이 되는 개념은 대량의 자가항원을 경구 혹은 비강으로 투여하는 것이 절대적인 조건이기 때문이다. 본 연구자들의 형질전환식물체를 이용한 인체자가항원의 대량 생산은 바로 이러한 문제를 해결한 것으로서 응용성과 상업적 이용 가능성이 매우 크다.

<10> 본 연구는 인체에서 갑상선 자가면역질환의 발생에 관여되는 자가항원 유전자 전체 또는 일부를 이용하여 식물에서 발현되는 특정 벡터에 삽입한 후 형질전환 식물을 개발하고 이로부터 진단용 및 치료용으로 대량의 대표적 인체자가항원인 human thyroid stimulating hormone receptor (hTSHR)을 생산하는 내용으로 구성된다. 인체의 자가항원인 갑상선 자극호르몬 수용체는 갑상선기능항진증의 발생에 있어서 자가항원으로 밝혀져 있다. 갑상선자극호르몬 수용체에 대한 항체는 갑상선 자극호르몬과 유사하게 갑상선 세포막에 발현되어있는 갑상선자극호르몬수용체를

자극하여 갑상선 호르몬의 생성을 증가시켜 갑상선 기능항진증을 유발한다. 따라서 갑상선 자극호르몬 수용체에 대한 IgG 항체의 검출은 갑상선 기능항진증 환자의 진단에 이용될 수 있으며 대량의 갑상선자극호르몬 수용체(hTSHR)를 생산할 수 있으면 경구관용요법에 이용할 수 있다. 환자에서 발견되는 갑상선 자극호르몬 수용체(hTSHR) 항체는 prokaryotic expression system에 의해서 발현된 유전자 재조합 단백질에는 결합하지 않는 것으로 밝혀져 있어 대장균에서 생산된 갑상선 자극호르몬 수용체(hTSHR)는 환자의 IgG 항체 검출에 이용될 수 없다. 또한 이러한 사실은 원핵세포에서 발현된 갑상선 자극호르몬 수용체(hTSHR)가 immunogen으로서 작용하기 위해서는 glycosylation과 같은 이차변화(secondary modification)이 있어야 함을 시사한다. 따라서 진단용 항원이나 경구 관용요법에 사용하기 위해서 eukaryotic expression system이 사용되어야 할 것으로 생각되고 있다. 최근의 vaccinia virus를 이용한 expression system으로 hTSHR을 발현할 경우에도 항체결합의 친화도가 낮아 상용화가 어려운 것으로 알려졌다.

<11> 연구자들의 형질전환식물체를 이용하는 인체자가항원 생산기술은 인체의 단백질을 식물에서 대량으로 생산하는 기술로서 새로운 차세대 약물개발기술(특히 자가면역치료에 이용되는 인체자가항원 생산기술)의 분야에서 핵심이 되는 기술이다.

<12> [국내의 현황]

<13> Molecular farming에 의한 의료용 단백질생산 기술개발은 현재 국내에서 개념도입 단계 혹은 초보적 기술개발단계에 있는 실정이다.

<14> [국외의 현황]

<15> 미국 및 캐나다를 위시한 선진국에서는 이미 molecular farming 기술에 의한 신의약품 생산기술을 일부에서 확보하였으며 1997년도 이후부터 동물실험등을 통하여 이러한 신의약품의 생물학적 효과를 입증하고 있다. 1997년도 이후 현재까지 미국 특허청에 본 연구과제와 유사한 molecular farming 기술을 이용한 특허는 다음과 같다.

- <16> 미합중국 특허 5,914,123: Vaccines expressed in plants
- <17> 미합중국 특허 5,484,719: Vaccines produced and administered through edible plants
- <18> 미합중국 특허 5,612,487: Anti-viral vaccines expressed in plants
- <19> 미합중국 특허 5,654,184: Oral immunization by transgenic plants
- <20> 미합중국 특허 4,956,282: Mammalian peptide expression in plant cells
- <21> 미합중국 특허 5,959,177: Transgenic plants expressing assembled secretory antibodies
- <22> 미합중국 특허 5,686,079: Oral immunization by transgenic plants
- <23> 미합중국 특허 5,679,880: Oral immunization by transgenic plants
- <24> 미합중국 특허 5,654,184: Oral immunization by transgenic plants
- <25> 미합중국 특허 5,484,719: Vaccines produced and administered through edible plants

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- <26> 이와같은 배경 하에 본 연구자들은 식물형질전환 기술을 이용하여 secondary modification된 항원성이 높은 재조합 hTSHR을 경제적으로 대량 생산하여 이를 이용하여 응용성이 높은 진단방법의 개발과 경구 관용요법에 이를 이용하고자 한다.

- <27> 본 발명의 목적은 형질전환식물체를 이용하여 대량생산된 재조합 인체자가면역항원을 제공하는 데 있다.
- <28> 본 발명의 다른 목적은 식물형질전환을 이용하여 발현된 항원성이 증가된 재조합 hTSHR을 이용하여 갑상선 자가면역질환을 진단하는 방법을 제공하는 데 있다.
- <29> 본 발명의 또 다른 목적은 식물형질전환을 이용하여 발현된 항원성이 증가된 재조합 hTSHR을 이용하여 사람을 제외한 포유류에 투여하는 방법을 제공하는 데 있다.

【발명의 구성 및 작용】

- <30> 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 형질전환식물체를 이용하여 대량생산된 재조합 인체자가면역항원을 제공한다.
- <31> 본 발명의 구체적인 실시예에 따르면, 상기 재조합 인체자가면역항원은 인간 갑상선자극 호르몬 (hTSHR)을 포함한다.
- <32> 본 발명의 다른 구체적인 실시예에 따르면, 상기 재조합 인체자가면역항원은 전체 또는 부분을 포함하여 증가된 면역활성을 나타낸다.
- <33> 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 식물형질전환을 이용하여 발현된 항원성이 증가된 재조합 hTSHR을 이용하여 갑상선 자가면역질환을 진단하는 방법을 제공한다.
- <34> 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 식물형질전환을 이용하여 발현된 항원성이 증가된 재조합 hTSHR을 이용하여 사람을 제외한 포유류에 투여하는 방법을 제공한다.

<35> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<36> 실시예 1. *tshr* 유전자의 cloning

<37> 이미 알려진 유전자 은행 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 인간 *tshr* cDNA 정보 (XM-056624, XM-041159, XM-041157)로부터 cDNA 염기서열을 확인하여 RT-PCR 방법으로 full length의 인간 *tshr*를 증폭하여 TA 벡터에 클로닝한 다음 sequencing을 통하여 human *tshr*를 확인하였다.

<38> i) *tshr* 유전자 전체의 cloning

<39> *tshr* 유전자 전체 (약 2.3kb)를 PCR기법을 이용하여 식물발현용 cassette를 소유하는 벡터의 cassette에 subcloning하기 위하여 먼저 GenBank database로부터 검색한 *tshr* 유전자 염기배열을 참고로 하여 design한 두개의 oligonucleotide를 합성한다. *tshr* 유전자의 5'-flanking region에 위치하는 primer는 *tshr* 유전자의 start codon과 cassette에의 cloning을 위한 제한효소 *Bam*HI의 인식부위를 포함 (5'-AAGGATCCC ATG AGG CCG GCG GAC-3') 하도록 디자인하고 3'-flanking region에 위치하는 primer는 *tshr* 유전자의 stop codon과 cassette에의 cloning을 위한 제한효소 *Bam*HI의 인식부위를 포함 (5'-ATGGATCC TTA CAA AAC CGT TTG CAT-3') 하도록 design 한다. PCR 시료조성은 1.25 unit Taq DNA polymerase (BM), 2.5 μ l 10x

buffer, 2 μ l 2.5 mM dNTP, 0.25 μ l 100 pM primers, 50ng *tshr* 유전자를 포함하는 DNA 총 25 μ l로 수행한다. PCR은 95°C에서 pre-denature 2분, 55°C에서 primer의 annealing 1분, 72°C에서 extension 1분, 92°C에서 denaturation 1분, 72°C에서 last extension 10분의 조건으로 30회 반응한다. PCR후 시료를 분석하기 위하여 4°C로 유지하였고 0.8% TAE agarose gel에 전기영동을 한 후 상응하는 크기의 band를 elution하여 원하는 *tshr* DNA 단편을 회수한다. Glass milk등을 사용하여 정제한 *tshr* 유전자 단편을 적절한 제한효소로 절단한 후

<40> 상응하는 제한효소로 절단한 식물발현용 cassette를 포함하고 있는 벡터내에 도입하여 제1도와 같은 *tshr* 유전자 식물발현용 cassette를 제작한다

<41> ii) *tshr* 유전자 일부의 cloning

<42> 인체에서 *tshr* 유전자가 발현되었을 때 생산되는 단백질 중 세포 외로 노출되는 extracellular domain 에 해당하는 유전자 (*tshr-ecd*, 약 1.24kb)를 PCR기법을 이용하여 식물 발현용 벡터의 cassette에 subcloning하기 위하여 먼저 GenBank database로부터 검색한

tshr 유전자 염기배열을 참고로 하여 design한 두개의 oligonucleotide를 합성한다. *tshr* 유전자의 5'-flanking region에 위치하는 primer는 *tshr* 유전자의 start codon과 cassette에의 cloning을 위한 제한효소 *Bam*HI의 인식부위를 포함하도록 디자인하고 (5'-AAGGATCCC ATG AGG CCG GCG GAC-3') 3'-flanking region에 위치하는 primer는 *tshr* 유전자의 시작으로부터 extracellular domain이 끝나는 1239번째 부근의 염기서열을 포함하도록 하며 새로운 stop codon과 cassette에의 cloning을 위한 제한효소 *Bam*HI의 인식부위를 포함하도록 디자인한다 (5'-ATGGATCC TTA GCC CAT TAT GTC TTC-3'). PCR 시료조성은 1.25 unit Taq DNA polymerase (BM), 2.5 μ l 10x buffer, 2 μ l 2.5 mM dNTP, 0.25 μ l 100 pM primers, 50ng *tshr* 유전자를 포함하는 DNA 총 25 μ l로 수행한다. PCR은 95℃에서 pre-denature 2분, 55℃에서 primer의 annealing 1분, 72℃에서 extension 1분, 92℃에서 denaturation 1분, 72℃에서 last extension 10분의 조건으로 30회 반응한다. PCR후 시료를 분석하기 위하여 4℃로 유지하였고 0.8% TAE agarose gel에 전기영동을 한 후 상응하는 크기의 band를 elution하여 원하는 *tshr* DNA 단편을 회수한다. Glass milk등을 사용하여 정제한 *tshr-ecd* 유전자 단편을 적절한 제한효소로 절단한 후 상응하는 제한효소로 절단한 식물발현용 cassette를 포함하고 있는 벡터 내에 도입하여 제2도와 같은 *tshr-ecd* 유전자 식물발현용 cassette를 제작한다.

<43> 실시예 2 식물형질전환

<44> i) *Agrobacterium tumefaciens* GV3101의 감염

<45> 식물체형질전환용 binary vector

pRD400 (제3도)에 cloning하여 획득한 실시예 1의 pRD400-*tshr*과 pRD400-*tshr-ecd*를 conjugation에 의하여 각각 아그로박테리움 튜머페이션스(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101(mp90); Plant-cell-rep. 1996. v. 15 (11) p. 799-803.)로 도입시킨다. 유전자가 도입된 아그로박테리움 선별하기 위하여 conjugation을 실시한 혼합액을 50 mg/L 가나마이신, 30 mg/L 겐타마이신이 첨가된 LB 고체배지에 도달한 후 28℃에서 2일 배양한 후 선별하였다. 선별된 유전자를 지닌 아그로박테리움을 슈퍼브로스 (BHI 배지, pH 5.6)에 접종한 후 28℃에서 2일간 배양한 후 식물체의 감염에 사용하였다.

<46> ii) 참외형질전환

<47> 소독한 참외 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, pRD400-*tshr*과 pRD400-*tshr-ecd*에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머페이션스(*Agrobacterium tumefaciens* GV3101(Mp90); Plant-cell-rep. 1996. v. 15 (11) p. 799-803.)를 100 μ M 아세토시린곤 (acetosyringone)이 함유된 슈퍼 브로스(Super broth: 37 g/L Brain heart infusion broth(Difco) 및 0.2% 수크로스, pH 5.6)에서 18시간 동안 28℃에서 배양한 다음, 배양액을 감염 배지를 이용하여 20배로 희석하였다. 상기 감염 배지 (pH 5.6)는 MSB5 (Murashige & Skoog medium including Gamborg B5 vitamins), 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES [2-(N-Morpholino)ethanesulfonic acid Monohydrate], 6.0 mg/L 키네틴, 1.5 mg/L IAA (Indole-3-acetic acid), 1.0 mg/LCuSO₄ · 5H₂O, 100 μ M 아세토시린곤 및 5% DMSO (dimethylsulfoxide)를 포함한다.

<48> 이어, 상기 자엽을 감염 배지 40 mL에 침지시키고 20분 동안 배양하 후, 자엽을 공동배양 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 6.0 mg/L 키네티, 1.5 mg/L IAA, 1.0 mg/LCuSO₄ · 5H₂O, 0.6% 아가, 100 μM 아세토시린곤 및 5% DMSO) 로 옮긴다. 암배양 조건 (26 ℃, 24시간 night)으로 3일 동안 공동배양 후, 자엽을 선발 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 6.0 mg/L 키네티, 1.5 mg/L IAA, 1.0 mg/L CuSO₄ · 5H₂O, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L카르베니실린)에 치상하고, 26℃ 온도와 4,000 Lux 조도에서 16시간 광조건에서 3주 동안 광배양 하여 신초의 발생을 유도 하였다. 신장된 신초를 발근 배지(MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 0.1 mg/L NAA (α-Naphtalene Acetic Acid), 1.0 mg/LCuSO₄ · 5H₂O, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린)에 이식하여 2주일 동안 배양하고, 형질전환된 것으로 추정되는 발근된 신초를 선별하였다.

<49> iii) 오이형질전환

<50> 소독한 오이 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, *pRD400-tshr*과 *pRD400-tshr-ecd*에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머페이션스를 상기의 i)과 같은 조건으로 배양하고 상기 오이 자엽 절편을 ii)참외형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합한다.

<51> 그런 다음, 2일 동안 26℃에서 광배양 조건으로 공동배양 배지 (BAP 2mg/L, NAA 0.01mg/L가 함유된 MSB5에서 광배양한 다음 저온 (4℃)에서 4일 동안 아그로박테리움 튜머페이션스 및 자엽을 공동배양 하였다. 그리고 나서, 자엽을 MS-B5, MES 0.5g/L, 3% sucrose, 0.4%Phytigel

을 기본으로 하는 선발 배지에 BAP 2 mg/L, NAA 0.01 mg/L, 카르베니실린 500 mg/L, 카나마이신 100mg/L을 추가하여 4주 동안 26℃ 및 8,000 Lux, 16시간/8시간 (광/암)의 조건에서 배양하였다. 이어, 재분화된 신허를 일정량의 NAA 0.01 mg/L, 카나마이신 100 mg/L 및 일정량의 아가 0.4%를 포함하는 발근 배지에 옮겨 26℃ 및 8,000 Lux, 16시간/8시간 (광/암)의 조건으로 배양하여 발근한 개체를 형질전환체로 추정하여 하기 실시예 7의 방법을 이용하여 분석하였다

<52> iv) 수박

<53> 소독한 수박 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 자엽을 채취하였다. 한편, *pRD400-tshr*과 *pRD400-tshr-ecd*에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머페이션스를 상기의 i)과 같은 조건으로 배양하고 상기 오이 자엽 절편을 ii)참외형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합한다. 그런 다음, BAP 2 mg/L가 함유된 공동 배양배지(4.04 g/L MSB5, 3.0% Sucrose, 0.5 g/L MES, 0.6% agar, pH 5.6)에 치상하고, 4000 Lux로 16시간의 광배양 조건에서 2일간 25℃ ± 1℃로 배양하였다. 배양한 자엽은 배지(MSB5, BAP 2 mg/L, 3.0% Sucrose, 0.5 g/L MES, 0.4% phytigel, pH 5.6, 카르베니실린 500 mg/L, 카나마이신 200 mg/L)에 치상 후 7일간 25℃ ± 1℃에서 4주간 배양하여 신허를 선발하였다.

<54> v) 유채

<55> 소독한 유채 종자를 파종하여 확보한 자엽을 생장점이 완전히 배제되도록 엽병을 채취하였다. 한편, *pRD400-tshr*과 *pRD400-tshr-ecd*에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머페이션스를 상기의 i)과 같은 조건으로 배양하고 상기 유채 엽병을 ii)참외형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 각각의 아그로박테리움을 혼합한 감염용액에 침지시켜 10분 동안 혼합한다. 그런 다음 공동 배지 (MSB5, 3% sucrose, 1 mg/L 2,4-D, 6.5 g/L agar power, pH 5.8)에 25℃에서 2일 배양한 후 4℃에서 4일 배양하였다. 형질전환된 유채를 선별하기 위하여 선발 배지 (MSB5, 3% sucrose, 5 g/L MES, 2 mg/L BA, 0.01 mg/L NAA, 20 mg/L kanamycin, 500 mg/L Pseudopen, 6.5 g/L agar power, pH 5.8)으로 옮긴 후 2주 동안 25℃, 16h 명/ 8h 암 조건에서 배양하였다. 2주 이후 성장한 신초의 뿌리를 유도하기 위하여 MSB5, 3% sucrose, 5 g/L MES, 0.1 mg/L NAA, 20 mg/L kanamycin, 500 mg/L Pseudopen, 6.5 g/L agar, pH 5.8 인 배지로 옮긴 후 뿌리를 유도하였다.

<56> vi) 담배형질전환

<57> 소독한 담배 종자를 파종하여 2주 이상 무균 배양한 신선하고 어린 담배잎을 채취한다. *pRD400-tshr*과 *pRD400-tshr-ecd*에 의해 형질전환된 아그로박테리움 튜머페이션스를 실시예 2 i) 과 같이 배양하여 실시예2 ii) 참외형질전환과 동일한 방법으로 조제한 감염배지에 혼합한다. 이 감염용액에 채취한 담배잎을 0.5-1cm² 의 크기로 절단하여 10-15분 동안 침지시킨 후, 공동배양 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, pH5.8, 0.6% 아가) 로 옮긴다. 암배양 조건 (26℃, 24시간 night)으로 2일 동안 공동배양 후, 잎 절편을 선발 배지 (MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 1.0 mg/L BAP, 0.1 mg/L NAA, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L 카나마이신 및 500 mg/L카르베니실린)에 치상하고, 26℃ 온도와 4,000 Lux

조도에서 16시간 광조건에서 2주 동안 광배양 하여 신초의 발생을 유도 하였다. 신장된 신초를 발근 배지(MSB5, 3.0% 수크로스, 0.5 g/LMES, 0.01 mg/L NAA, 0.6% 아가, pH5.6, 100 mg/L카나마이신 및 500 mg/L 카르베니실린)에 이식하여 2주일 동안 배양하며 형질전환된 것으로 추정되는 발근된 신초를 선별하였다.

<58> 실시예 3. 식물형질전환체의 PCR 확인

<59> 상기 실시예 2에서 확보한 형질전환체의 확인은 다음과 같이 실시하였다.

<60> 선발 배지에서 형질전환체로 선발된 신초 10 mg으로부터 Edwards 방법 (*Nucleic Acids Research*, 19:1349(1991))을 사용하여 식물 지놈 DNA를 분리한 후, 이를 주형 DNA로 하여 PCR 분석을 실시하였다.

<61> tshr의 형질전환식물체의 PCR 분석에서 사용된 프라이머는 *tshr* 유전자의 염기 서열에 대응하는 것으로서, 전방향 프라이머는 5'-AAGGATCCC ATG AGG CCG GCG GAC-3'이고, 역방향 프라이머는 5'-ATGGATCC TTA CAA AAC CGT TTG CAT-3'이다.

<62> tshr-ecd의 형질전환식물체의 PCR 분석에서 사용된 프라이머는 *tshr-ecd* 유전자의 염기 서열에 대응하는 것으로서, 전방향 프라이머는 5'-AAGGATCCC ATG AGG CCG GCG GAC-3'이고, 역방향 프라이머는 5'-ATGGATCC TTA GCC CAT TAT GTC TTC-3'이다.

<63> PCR 반응은 Taq 중합효소를 이용하여, 96℃에서 2분간 전변성한 후, 94℃에서 1분간 변성, 55℃에서 1분간 어닐링, 72℃에서 2분간의 중합반응을 35회 반복하였고, 추가로 72℃에서 10분간 연장반응을 하였고, 반응 산물은 1.0% 아가로스 겔에서 분석하였다.

<64> 도 4에서 M 레인은 1 kb 레더, 1레인은 유전자를 포함하는 양성표준

플라스미드 *pRD400-tshr*의 PCR 산물, 2,4,6,8,10 레인은 각각 야생종 담배, 참외, 오이, 수박의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR 산물, 3,5,7,9,11 레인은 각각 선발된 담배, 참외, 오이, 수박 형질전환체의 DNA를 주형으로 한 PCR 산물들을 로딩 하였다.

<65> 도 5에서 M 레인은 1 kb 레더, 1 레인은 유전자를 포함하는 양성표준 플라스미드 *p*

*RD400-tshr-ecd*의 PCR 산물, 2,4,6,8,10 레인은 각각 야생종 담배, 참외, 오이, 수박의 염색체 DNA를 주형으로 한 PCR 산물, 3,5,7,9,11 레인은 각각 선발된 담배, 참외, 오이, 수박 형질전환체의 DNA를 주형으로 한 PCR 산물들을 로딩 하였다.

<66> 실시예 4.

<67> 형질전환식물체의 잎 1g을 잘라서 막자사발에 넣고 미리 제조한 2.5mL 추출완충액 (5mL 100mM Tris-Cl, pH 7.5, 40 500mM EDTA, pH 8.0, 1.5mL 1mg/mL leupeptin, 600 μ L 5mg/mL BSA, 3mL 1mg/mL DTT, 사용직전에 30mg/mL *PMSF(stock ; 0.003g PMSF in 10 μ L IPA) 50 μ L를 첨가)를 가하여 미세하게 간다. 추출액을 12,000rpm, 4℃에서 30분 이상 원심 분리한 후 상층액을 취하여 새 튜브로 옮기고 얼음에 보관한다.

<68> Bradford의 방법에 의해 상기의 식물 추출액에 dye reagent(protein assay kit,

Bio-Rad)를 넣고 UV-spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하고 bovine serum albumin standard와 비교해서 형질전환식물체의 단백질정량을 실시한다. 이 상등액을 단백질의 양이 동일하도록 조정하여 각각 시료로 하여 8% 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하였다.

<69> 상기의 폴리아크릴아마이드 젤 전기영동을 하여 나타난 단백질 밴드를 PVDF 멤브레인에 전이한 후, 단백질이 전이된 PVDF 멤브레인에 1차 항체(anti TSHR-rabbit, 1:1000희석)를 가하여 1시간 배양을 한다. 배양 후 멤브레인을 세척한 후 2차 항체(rabbit-goat HRP, 1:1000희석)를 가하고 다시 1시간 배양을 하고 멤브레인을 세척한다. 항체의 부착이 완결된 후 4-chloro-1-naphthol (4-CN)을 기질로 하여 발색반응을 실시하여 TSHR 또는 TSHR-ECD 단백질의 예상 크기에의 발색밴드를 조사하여 TSHR 또는 TSHR-ECD단백질의 존재를 확인하였다(제6도).

<70> 실시예 5.

<71> 식물체에서 발현된 갑상선호르몬수용체 (TSHR) 및 갑상선호르몬

<72> 수용체의 세포의 영역 (TSHR-ECD)의 Immunoassay.

【발명의 효과】

<73> 현재 형질전환식물체를 이용한 Molecular farming 및 edible vaccine기술은 새로운 치료제의 개발기술로서 이러한 기술을 이용한 인체자가항원의 대량생산 기술개발은 자가면역질환의 진단 및 치료에 관련된 기술은 농림기술산업, 차세대 제약기술산업, 진단기술 분야와 관련을 가지고 있으며 본 발명을 통하여 생산되는 고효성을 갖는 대량의 인체자가항원은 경제성이 높은 진단 키트의 개발 및 자가면역질환 치료제 개발기술로 그 수요가 창출될 것이다.

102 88064

출력 일자: 2003/8/8

【특허청구범위】**【청구항 1】**

형질전환식물체를 이용하여 대량생산된 재조합 인체자가면역항원.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 인체자가면역항원은 인간 갑상선자극호르몬 (hTSHR)을 포함함을 특징으로 하는 재조합 인체자가면역항원.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 재조합 인체자가면역항원은 전체 또는 부분을 포함하여 증가된 면역활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 재조합 인체자가면역항원.

【청구항 4】

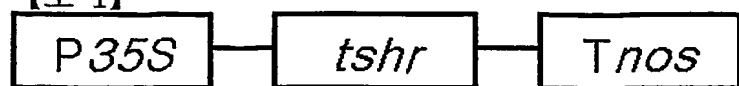
식물형질전환을 이용하여 발현된 항원성이 증가된 재조합 hTSHR을 이용하여 갑상선 자가 면역질환을 진단하는 방법.

【청구항 5】

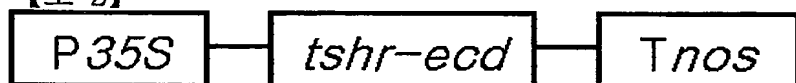
식물형질전환을 이용하여 발현된 항원성이 증가된 재조합 hTSHR을 이용하여 사람을 제외한 포유류에 투여하는 방법.

【도면】

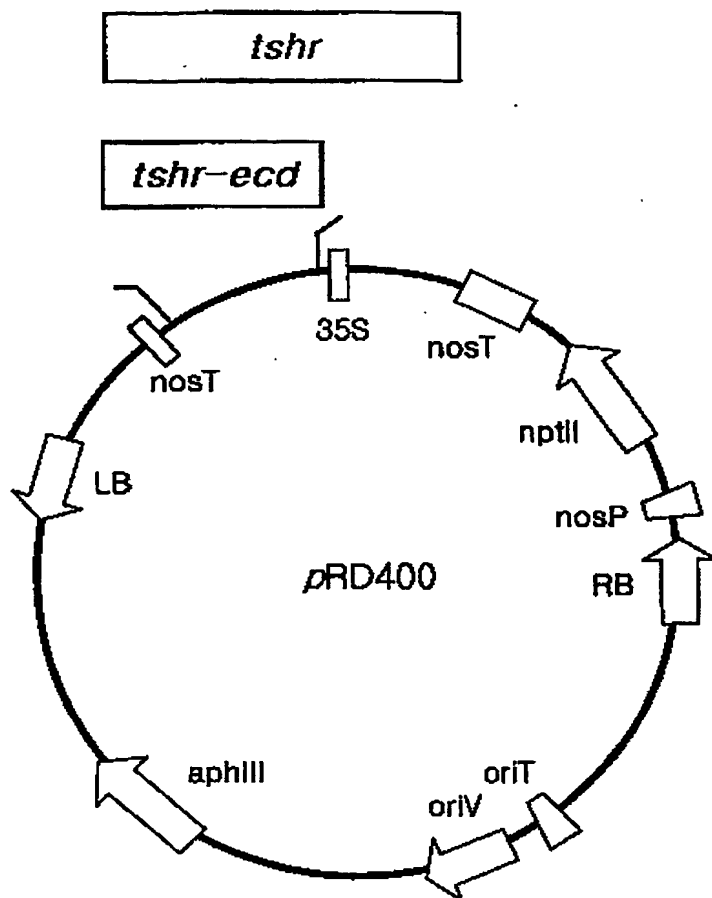
【도 1】



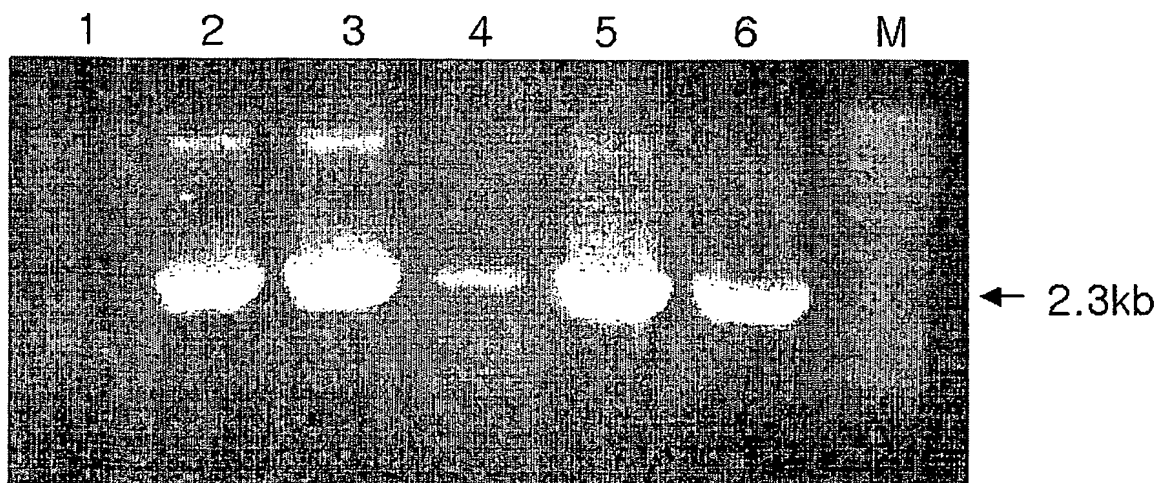
【도 2】



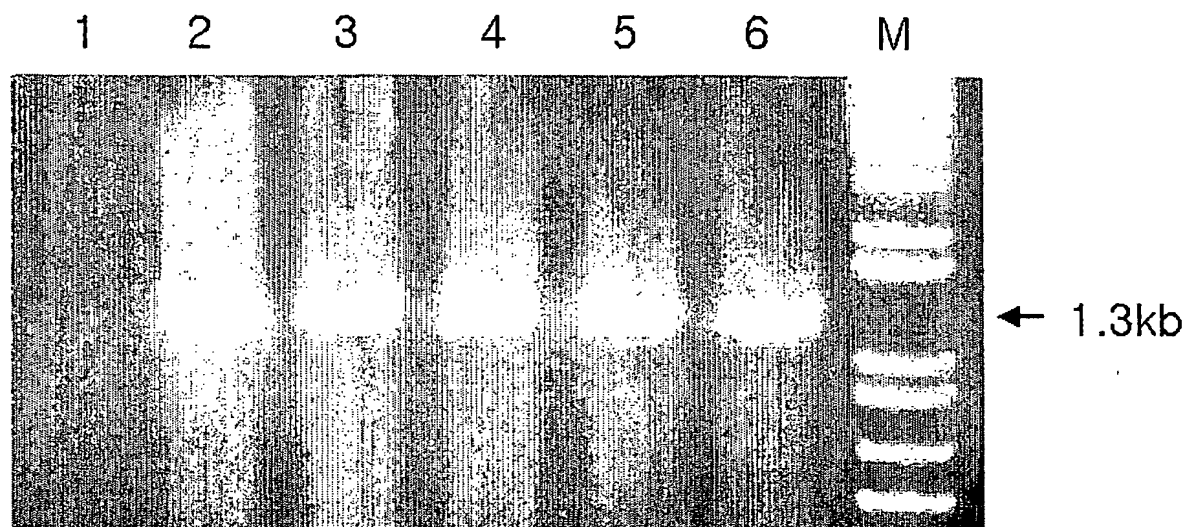
【도 3】



【도 4】



【도 5】



【도 6】

